



TITLE:

葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ に依存した電子伝達経路の解明

AUTHOR(S):

遠藤, 剛

CITATION:

遠藤, 剛. 葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼに依存した電子伝達経路の解明. 2003

ISSUE DATE:

2003-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85018>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼに依存した 電子伝達経路の解明

(研究課題番号 13640646)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))
研究成果報告書



平成 15 年 3 月

研究代表者 遠藤 剛
(京都大学生命科学研究科)

科研

002

291

はしがき

葉緑体は、シアノバクテリアが原始原核細胞に共生して生じたと考えられる細胞内小器官である。この共生の過程で多くの遺伝子が失われたにもかかわらず、葉緑体ゲノムには、ミトコンドリア呼吸電子伝達の NADH dehydrogenase 複合体(NDH)のサブユニットに高い相同性を示す *ndh* 遺伝子群があり、転写、翻訳されていることが知られている。本研究の目的は本来呼吸電子伝達鎖の一員である NDH が葉緑体でどのような機能を果たしているかを明らかにすることを目的として企画された。これまでの研究により、NDH が光合成電子伝達と共役して光化学系 I の循環的電子伝達に機能していることが明らかにされてきた。本研究により、この NDH 依存の循環的電子伝達が光・酸素ストレス緩和に機能していることが明らかにすることができた。

ここにその成果の具体的内容をまとめた。これらの研究の遂行においては、京都大学生命科学研究科、全能性統御機構学分野の構成員ならびに学内外の多くの研究者の助力を得たことに心より感謝したい。

研究組織

標記の 研究代表者：遠藤 剛（京都大学生命科学研究科・講師）

当該研究期間中に発表した主要国際論文の総取りを維持することでも研究の成果とする。

本研究では、NAD(P)⁺デヒドロゲナーゼ (NDH) の機能を解明することを目的とし、NDH 複合体の精製と NDH 欠損細胞を材料とした生体内実験を行った。

研究経費

まず精製について、当研究室、製剤体の準備が可能な条件下で、生体内実験の準備的精製を行ったが、産物出稼中の NDH 量が非常に少ないことが判明したため、十分な精製

平成 13 年度 1700 千円

平成 14 年度 1300 千円

計 3000 千円

NDH 活性測定法を開発し、精製した NDH 複合体をスクリーニングした結果、一部の C4 植物において、非常に高い NDH 活性を見出した。入手しやすい C4 植物を材料として精製を行った。精製には、葉緑体の分離、チラコイド膜の可溶性化、特イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過を用いた。活性測定には NAD(P)⁺フェリシアン化カリウムの酸化還元反応を、タンパク質の測定には NDH-H 抗体によるウェスタン解析を利用した。

また、NDH の生体機能については、新たに NDH-N1 および NDH-N2 を欠損した葉緑体形質転換体を作成し、紫外ストレスによる葉緑体機能の障害に NDH に依存する循環的電子伝達系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上の研究により、葉緑体 NDH の機能について重要な新発見を得ることができたとともに、さらなる研究の基礎を築くことができたと思われる。

研究成果

標記の研究テーマについて得られた研究成果の概要をここに示すとともに、当該研究期間中に発表した主要関連論文の別刷りを添付することで本研究の成果とする。

本研究では、NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (NDH) の機能を解明することを目的とし、NDH 複合体の精製と NDH 欠損形質転換体を用いたストレス耐性実験を行った。

まず精製について、当初は、葉緑体の単離が容易なホウレンソウを用い、予備的精製を行ったが、粗抽出液中の NDH 量が予想に比べかなり低いことが判明したため、十分な精製標品を得ることが難しいと判断した。そこで、NDH 活性の高い植物をスクリーニングするため、クロロフィル蛍光法による簡便な NDH 活性測定法を開発し、実際に 200 種弱の植物種をスクリーニングした結果、一部の C4 植物において、非常に高い NDH 活性を見出した。入手しやすい C4 種を材料として精製を行った。精製には、葉緑体の単離、チラコイド膜の可溶化、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過を用いた。活性測定には NADPH/フェリシアン化カリウムの酸化還元測定を、タンパク質の同定には NDH-H 抗体によるウェスタン解析を利用した。

また、NDH の生理機能については、新たに NDH-KJ および NDH-CJK を欠損した葉緑体形質転換体を作成し、強光ストレスによる過還元状態の回避に NDH に依存する循環的電子伝達系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上の研究により、葉緑体 NDH の機能について重要な新知見を得ることができたとともに、さらなる研究の基盤を整えることができたと考える。

(2) 総説

1. 高橋 豊 (2002) PAMクロロフィル蛍光計による光合成測定の問題と応用 植物の生長調節 37: 69-78

研究発表

(1) 学会誌等

1. Takabayashi, A., Endo, T., Shikanai, T., and Sato, F. (2001). Post-illumination reduction of plastoquinone pool in NDH deficient tobacco mutants. In Proceedings in International Congress of Photosynthesis. (Brisbane: CSIRO Publishing), S14-017.
2. Endo, T., Takabayashi, A., Shikanai, T., and Sato, F. (2001). Defect in chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex resulted in stromal over-reduction after exposure to strong light. In Proceedings in International Congress of Photosynthesis. (Brisbane: CSIRO Publishing), S11-018.
3. Takabayashi, A., Endo, T., Shikanai, T., Sato, F. (2002). Post-illumination reduction of the plastoquinone pool in chloroplast transformants in which chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase was inactivated. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66, 2107-2111.
4. Ikezawa, N., Ifuku, K., Endo, T., Sato, F. (2002). Inhibition of photosystem II of spinach by the respiration inhibitors piericidin A and thenoyltrifluoroacetone. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66, 1925-1929.
5. Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T., Sato, F. (2002). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impaired *psbO*, one of two genes encoding extrinsic 33-kDa proteins in photosystem II. *FEBS Lett.* 523, 138-142.

(2) 総説

1. 遠藤 剛 (2002). PAMクロロフィル蛍光計による光合成測定 of 原理と応用 植物の生長調節 37: 69-75.

2. 遠藤 剛 (2002). クロロフィル蛍光の測定から見えてくる世界 化学と生物 40: 402-405

Post-illumination reduction of plastoquinone pool in *Andh* tobacco mutants

3. 遠藤 剛 (2002). クロロフィル蛍光による光合成阻害剤の阻害部位の決定 日本農薬学会誌 27: 307-309

¹Department of Plant Gene and Technology, Division of Integrated Life Science, Graduate School of Bioscience, Kyoto University, Aochi-cho, Sakae, Kyoto 606-8501, Japan
Fax: +81-75-753-6395, e-mail: mizuho@Q.azc.kyoto-u.ac.jp

²Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

Keywords: NAD(P)H dehydrogenase, Cyclic electron flow, Photoinhibition

Introduction

Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase (NDH) of higher plant is homologous of eubacterial and mitochondrial complex I in the respiratory chain. NDH consists of 11 subunits encoded in the plastid genome and of unidentified subunits working for oxidation of NAD(P)H, and has native NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. Physiological role of NDH is still uncertain. One possible role is participating in cyclic electron flow around PS I. Although it seldom produces both ATP and NADPH, cyclic electron flow around PS I is supposed to produce only ATP. Therefore cyclic electron flow around PS I bears the more important role under the stress condition which requires more ATP than normal growth condition. Reverse genetics is the strong tool to analyze physiological function. Using plasmid transformation in tobacco plant, several groups including us succeeded in generating *Andh* mutants (Burns et al., 1998; Krifa et al., 1998; Shikanai et al., 1998; Horvath et al., 2000). Their *Andh* mutants phenotypically showed same phenotypic traits as wild type under the normal growth condition, but some reports suggested that stress conditions were unfavorable for *Andh* mutants (Sazanov et al., 1998; Horvath et al., 2000). We previously reported that short but strong light illumination led *Andh* mutants to severer photoinhibition than wild type (Endo et al., 1999). To characterize the mechanism of severe photoinhibition in *Andh* mutants, we further studied this phenomenon by means of chlorophyll fluorescence analysis.

Materials and Methods

Plants

Transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) *AndhB* in which *ndh B* gene was functionally inactivated by the *accA* chimeric gene and control transformant with non-destructive insertion of the *accA* chimeric gene between *recL* and *accD* (4V26) were used as reported previously (Shikanai et al., 1998). To compare the *Andh* phenotype, another transformed tobacco line of in which an *ndh C/A* operon was functionally inactivated by an *accA* chimeric gene (*AndhCKJ*) was also used (Takabayashi et al. in preparation).

Measurement of Chlorophyll Fluorescence

Chlorophyll fluorescence was measured with a F44B-2000 portable fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The maximum yield of chlorophyll fluorescence (F_m) was induced by a 1-s pulse of saturating white light. Far-red light (670 nm , 3 W m^{-2}) from an LED and actinic